

## РАЗВИТИЕ МУЖСКОГО И ЖЕНСКОГО ГАМЕТОФИТОВ У *ARABIDOPSIS THALIANA* (L.) HEYNH

Т. Ф. Полякова

В последние годы *Arabidopsis thaliana* находит все более широкое применение в различных научно-исследовательских учреждениях в качестве объекта генетических исследований (Квитко и Мюллер, 1961). Однако цитологически это растение мало изучено. В литературе имеются данные лишь о числе его хромосом (Laibach, 1907; Jaretsky, 1928; Steinitz-Sears, 1962) и некоторые сведения о мейозе у диплоидов, триплоидов, тетраплоидов и гексаплоидов (Steinitz-Sears, 1962). Поскольку успех генетического исследования тесно связан с цитологической изученностью объекта, возникла необходимость исследовать процессы микро- и макроспорогенеза, уделив главное внимание мейозу.

Семена арабидонсиса из коллекции лаборатории генетики растений высевались в небольшие вазоны со стерилизованной почвой в разное время года, но преимущественно летом. В одном вазоне росло несколько десятков растений. Примерно через месяц после посева семян можно было уже производить фиксацию материала. Так как в момент фиксации цветки очень мелкие, то фиксировать приходится целые соцветия без предварительного просмотра пыльников и андрокармие.

Фиксирующими смесями служили смеси Навашина (10:4:1), Карпуз (6:3:1 и 3:1) и Модилевского. Наилучшие результаты дал фиксатор Навашина, который в основном и был использован в работе. Затем срезы толщиной в 10 мк были окрашены железным гематоксилином по Гейденгайну и обработаны по Фельгену. Исследование проведено с бинокулярной насадкой  $\frac{AV12}{1.5}$ . Рисунки сделаны с помощью рисовального аппарата Аббе при увеличении ок. K10X, K15X, K20X, об. Аро 90X.

Микроспорогенез. У *Arabidopsis thaliana*, как и у других крестоцветных, в цветке закладывается 6 пыльников. Пыльники очень небольшие: в момент образования археспориальных клеток их длина составляет около 100—125 мк, а ширина и толщина отдельного гнезда около 40—50 мк. Обычно при продольном разрезе гнезда пыльника клетки археспория располагаются на 2—3 срезах. По сравнению со столь небольшой величиной пыльников клетки археспория довольно крупные: по данным измерений 50 клеток на продольных срезах пыльников, длина их варьирует от 8 до 17,5, а ширина — от 6 до 12 мк.

В пыльнике закладывается четыре группы спорогенных клеток, т. е. пыльники у арабидонсиса, как и у большинства покрытосемянных, — четырехгнездные. В момент формирования археспориальной ткани в пыльнике хорошо можно различить клетки тапетума, которые

в это время сравнительно небольшие и одноядерные; тапетум секреторного типа. Археспорий многоклеточный, клетки его имеют, как обычно, многогранную форму и содержат ядро с большим округлым ядрышком. Часто можно было наблюдать картины отпочковывания от ядрышка микроядрышка (рис. 1, а). По-видимому, в зависимости

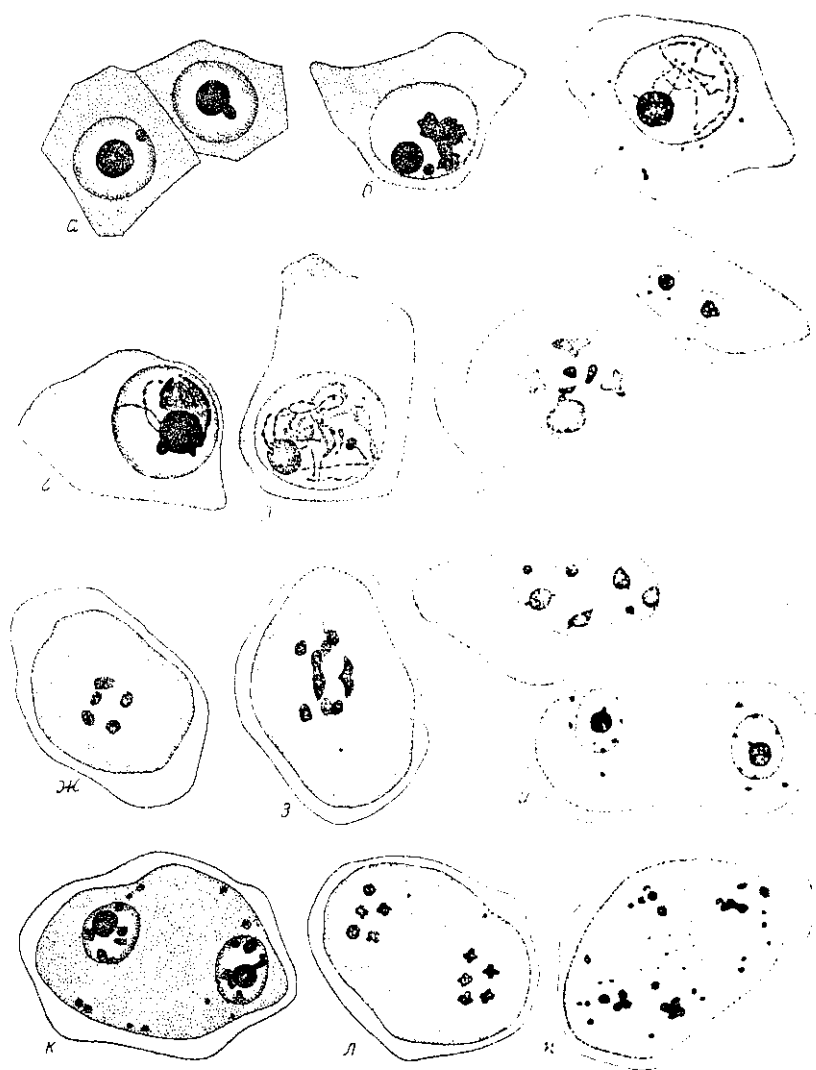


Рис. 1. Стадии мейоза в процессе микроспорогенеза у *L. thaliana*

Фиксатор—смесь Навашина 10:4:1, окраска железным гематоксилином (1:1:10), об. Аро 90 X); а — клетки археспория (отпочковывание микроядрышка); б — первое сокращение хромосом (синезезис 1-й); в — зигонема; г — второе сокращение хромосом (синезезис 2-й); д — диплонама; е — диакинез (вверху клетка тапетума); ж — метафаза I; з — анафаза I (неодновременное расхождение хромосом); и — пикнокинез (вверху клетка тапетума); к — профаза II; л — метафаза II (двойственное строение хромосом); м — анафаза II.

от стадии развития археспория это явление может наблюдаться в одних пыльниках буквально в каждой клетке археспория, в других — не встречается совсем. Начало мейоза характеризуется увеличением клеток археспория, которые, однако, продолжают сохранять неправильную форму и тесное расположение. В это время весь хроматин ядра сбивается в неправильный клубок, из которого в отдельных

местах торчат концы тонких нитей; это состояние напоминает синезе-сис — первое сокращение хромосом, приходящееся на наиболее ран-нюю стадию профазы мейоза — лептоному. И в этот момент в ядре рядом с крупным ядрышком часто можно видеть микроядрышко или наблюдать картины его отпочковывания от ядрышка (рис. 1, б).

На более поздней стадии мейоза, когда происходит значительное увеличение спорогенных клеток и их округление, в ядрах обнаруживаются нитевидные хромосомы с хорошо выраженным хромерным строе-нием, которые часто концентрируются на одной стороне ядра, в районе ядрышка. В отдельных случаях наблюдается продольное попарное сближение некоторых нитей. По-видимому, это стадия зигонемы (рис. 1, в). Крупное ядрышко в это время часто принимает очень непра-вильную форму. Клетки тапетума при этом значительно увеличивают-ся, и ядра многих из них делятся митотически.

Следующую за зигонемой стадией пахиномы наблюдать не удалось, так как, по-видимому, на этой стадии происходит второе сокращение хромосом. Но в отдельных случаях встречались следующие картины: 1) весь хроматин ядра сжат в плотный, темно окрашенный комок, кото-рый располагается около ядрышек — крупного и мелкого, а рядом с комком в контакте с ядрышком видна пара продольно конъюгирую-щих нитей (рис. 1, г), 2) на более тонких срезах видны куски пере-резанных толстых нитей, по-прежнему скученных в районе ядрышек. На этой стадии многие клетки тапетума становятся двухъядерными, вакуолизируются и значительно увеличиваются.

Стадию диплономы удалось проанализировать только в единич-ных случаях, так как биваленты, довольно крупные на этой стадии, рас-полагаются в ядре очень скученно, налегая друг на друга. В некоторых случаях в ядре можно было различить отдельные биваленты примерно одинаковой величины, за исключением одного несколько более круп-ного и одного более мелкого. Это соответствует величине соматических хромосом у данного вида арабидопсиса, у которого имеются четыре пары более длинных хромосом и одна пара коротких хромосом. На рис. 1, д изображена одна из клеток в стадии диплономы, а на рис. 2, а — отдельные биваленты.

На стадии диплономы концы бивалентов большей частью обраще-ны к ядрышку, и часто трудно бывает решить, какой же из них связан с ядрышком. Очень интересно поведение микроядрышка на стадиях зигонемы и диплономы. Часто кажется, что оно связано с хромосомами так же, как и крупное ядрышко. Это можно видеть на рис. 1, д и 2, б (на последнем изображены более достоверные картины связи).

Из всех стадий профазы первого деления мейоза наиболее досту-пен анализу диакинез. В диакинезе в ядре сравнительно хорошо видны пять укороченных компактных бивалентов. Наблюдаются палочкообразные, х-образные и кольцообразные биваленты. Форма бивалентов в раннем диакинезе изображена на рис. 2, в. Она лучше видна на препаратах, окрашенных железным гематоксилином, нежели после обработки по Фельгену. Во время позднего диакинеза в ядре обычно наблюдается только одно крупное ядрышко; судьба микро-ядрышка остается неизвестной. Возможно, что оно первым растворяет-ся в ядре, как более мелкое. Клетки тапетума во время диакинеза еще более увеличиваются и вакуолизируются, большинство из них стано-вится двухъядерными (рис. 1, е). Ядра дают интенсивную реакцию Фельгена, ДНК находится в виде гранул, расположенных большей частью по периферии ядра.

В метафазе I при рассматривании с полюса можно насчитать пять бивалентов, из которых один более крупный и один более мелкий (рис. 1, ж). При рассматривании с экватора можно различить форму бивалентов — х-образную или кольцеобразную. Все биваленты дают одинаково интенсивную реакцию Фельгена.

В анафазе I расхождение хромосом происходит неодновременно, раньше всех расходятся хромосомы самого мелкого бивалента и позднее всех — самого крупного (рис. 1, з). В поздней анафазе обнаруживается двойственность хромосом — их расщепление на хроматиды.

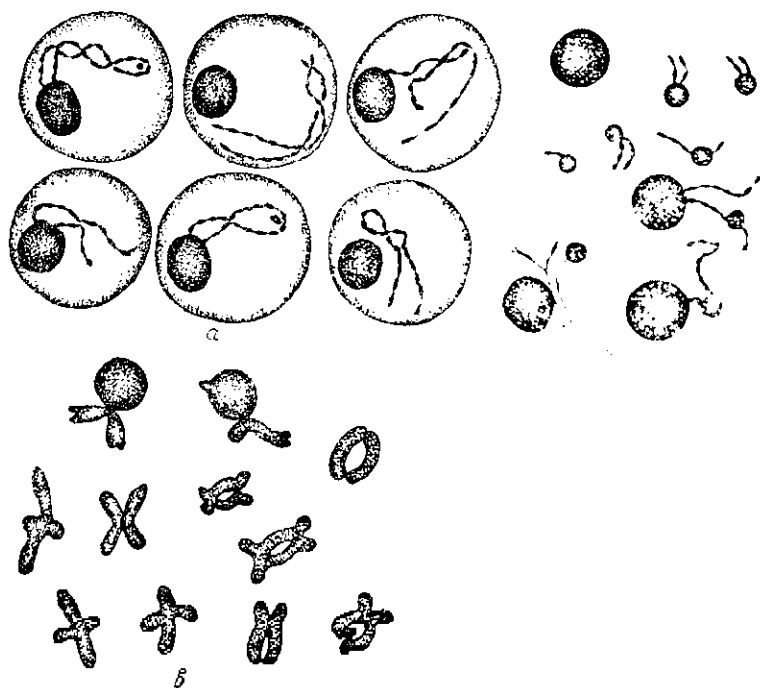


Рис. 2. Типы бивалентов и связь микроядрышки с хромосомами в профазе I мейоза.

Фиксатор — смесь Навашина 10:4:1, окраска железным гематоксилином (А. М. Мухоморова, об. Арх. 90-91); а — биваленты анитотетной стадии; б — биваленты метафазной стадии; в — биваленты анафазной стадии; г — биваленты телофазной стадии.

В телофазе I по мере приближения к интеркинезу величина хромосом постепенно уменьшается; вокруг каждой группы хромосом появляется светлая зона, и постепенно телофаза I сменяется интеркинезом. В интеркинезе образуется одно крупное ядрышко. Внимательный просмотр позволяет обнаружить в каждом ядре пять мелких, довольно сильно красящихся гематоксилином гранул, — возможно гетерохроматиновых районов хромосом. Одна из гранул несколько крупнее остальных, а вторая постоянно связана с ядрышком. Анализ интеркинетических ядер несколько затруднен из-за зернистости, появляющейся в это время в цитоплазме и преимущественно в районе ядер. Клетки тапетума становятся очень крупными, в их ядрах, как правило, содержится несколько ядрышек (рис. 1, и).

Профазу II удалось обнаружить лишь в единичных случаях. Величина ядер и ядрышек здесь увеличивается, по сравнению с интеркинезом; более четко обнаруживается ядерная оболочка; хромосомы стано-

вятся крупнее, в некоторых случаях видно их двойственное строение, одна из хромосом по-прежнему связана с ядрышком (рис. 1, к).

В метафазе II сохраняется двойственность хромосом (рис. 1, л). Наблюдается как взаимно-перпендикулярное, так и параллельное расположение веретен деления.

В анафазе II после расхождения хроматид двойственное строение хромосом исчезает, хромосомы становятся более мелкими, но их по-прежнему хорошо можно сосчитать.

В телофазе II хромосомы располагаются скученно. При окрашивании гематоксилином в цитоплазме появляется масса базофильных гранул (рис. 1, м). В поздней телофазе образуются ядерная оболочка и ядрышко. Телофаза II постепенно переходит в интерфазу. Микрогаметогенез заканчивается образованием тетрад микроспор двух типов: тетраэдриального и изобилатерального. Ко времени образования тетрад клетки талетума начинают дегенерировать.

Заканчивая изложение мейоза, считаем необходимым отметить, что исследование ранних стадий мейоза у арабидопсиса нельзя считать законченным, его необходимо продолжить.

Развитие пыльцевого зерна и процесс спермиогенеза значительно легче наблюдать на препаратах, обработанных по Фельгену, нежели на препаратах, окрашенных гематоксилином. Эти процессы протекают одинаково у многих других покрытосемянных, и не представляют собой особой специфики. Характерным здесь является, пожалуй, то, что у арабидопсиса, так же как и у других крестоцветных, в связи с малой величиной хромосом последние очень хорошо можно подсчитать даже на ранних стадиях профазы, так как они небольшие и располагаются в ядре очень свободно.

Перед началом деления первичное ядро микроспоры и сама микроспора увеличиваются, стенка становится более толстой, вакуоль уменьшается. Делится ядро в пристенном положении (рис. 3, б—г). Образовавшиеся в результате деления первичного ядра микроспоры генеративная клетка имеет линзовидную форму и тесно прилегает к стенке микроспоры (рис. 3, г). Ядро ее фельгенположительно. Вегетативное ядро располагается в центре и дает отрицательную реакцию Фельгена.

Вскоре после образования генеративной клетки ядрышко вегетативного ядра начинает увеличиваться. Постепенно генеративная клетка округляется и отделяется от стенки микроспоры, приближаясь к вегетативному ядру. Ядрышко последнего еще более укрупняется, и в нем, так же как и в цитоплазме вегетативной клетки, появляется масса базофильных гранул (рис. 3, е). Находясь в непосредственной близости от вегетативного ядра и располагаясь большей частью на его поверхности, генеративная клетка приступает к делению (рис. 3, ж—к). В профазе спермиогенеза ядро генеративной клетки принимает несколько вытянутую форму, число хромосом на этой стадии сосчитать трудно. В метафазе и анафазе в клетке хорошо насчитывается пять мелких, интенсивно красящихся по Фельгену хромосом.

По окончании спермиогенеза ядрышко вегетативного ядра уменьшается (рис. 3, л), и в более зрелых микроспорах, очевидно перед распусканием цветка, его уже не различить в ядре, да и само вегетативное ядро обнаруживается с большим трудом. Оно имеет неправильную форму и по-прежнему фельгенотрицательно, как и на всех предыдущих стадиях, в противоположность ядру генеративной клетки, которое с начала и до окончания спермиогенеза остается фельгенположительным (рис. 3, м). В этом отношении наши данные находятся в противоречии с данными Г. М. Ильиной (1962), которая утверждает, что первичное

ядро микроспоры у горчицы, также относящейся к семейству крестоцветных, дает очень слабую реакцию Фельгена и что генеративное ядро вначале фельгенотрицательно, а фельгенположительным становится только через некоторое время после накопления в нем ДНК.

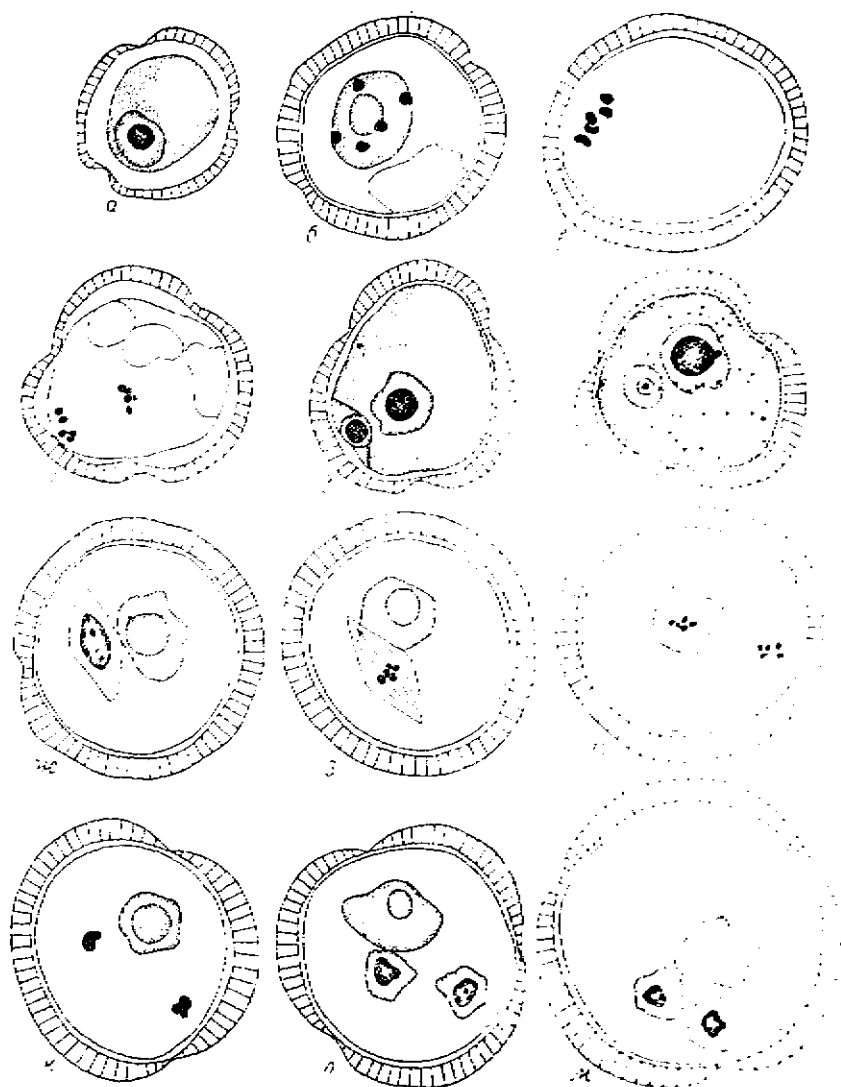


Рис. 3. Развитие мужского гаметофита.

Фиксатор—смесь Навашина 10:4:1 (ок. К 20%, об. Аро 9%). а — зрелая микроспора (окраска железным гематоксилином); б-г — деление первичного ядра микроспоры (реакция Фельгена); б — профазы; в — метафазы; г — анафазы; д-е — деление вторичного ядра микроспоры (реакция Фельгена); д — более ранняя стадия; е — более поздняя; ж-з — деление вегетативной клетки (реакция Фельгена); ж — профазы; з — метафазы; и — анафазы; л — телофазы; и-л — вегетативная клетка и вегетативное ядро по окончании сперматогенеза (реакция Фельгена); и-л — зрелые клетки и вегетативное ядро перед распусканием пыльника (реакция Фельгена).

Таким образом, у арабидопсиса, как и у остальных крестоцветных, зрелое пыльцевое зерно трехклеточно, имеет толстую стенку со столбчатой структурой и три поры.

Макроспорогенез. У *Arabidopsis thaliana* завязь, как и у других крестоцветных, ложнодвугнездная. В завязи закладывается



Рис. 4. Макроспорогенез и развитие женского гаметофита.

Фиксатор: смесь Навашина 10:4:1 (окраска железным гематоксилином): а — клетка археспория (отпочковывание ядрышка) (ок. К 15 %, об. Аро 90 ×); б — метафаза I (ок. К 15 %, об. Аро 90 ×); в — одноядерный зародышевый мешок (ок. К 10 %, об. Аро 90 ×); г — двухядерный зародышевый мешок (ок. К 10 %, об. Аро 90 ×); д — четырехядерный зародышевый мешок (ок. К 10 %, об. Аро 90 ×); е — несформированный восьмijадерный зародышевый мешок (ок. К 10 %, об. Аро 90 ×); ж — зародышевый мешок перед оплодотворением (ок. К 10 %, об. Аро 90 ×).

от 30 до 50 семязпочек, располагающихся в разных плоскостях. Семязпочки арабидопсиса, как и у остальных крестоцветных, относятся к тунуинцеллярному типу и состоят из клеток нуцеллуса, покрытых эпидермисом. Закладываются они в виде маленьких бугорков, состоящих из меристематических клеток, покрытых эпидермисом. В это время семязпочки прямые. На более поздней стадии развития в ткани нуцеллуса под эпидермисом начинает выделяться одна более крупная клетка — клетка археспория. В ее ядре также наблюдаются картины отпочковывания от ядрышка микроядрышка (рис. 4, а). Археспориальная клетка непосредственно, без образования кроющих клеток, превращается в материнскую клетку макроспор. В последней можно видеть отдельные стадии мейоза: зиготему, диакinesis, метафаза I (рис. 4, б). В профазе мейоза в ядре лежат два ядрышка — крупное и мелкое.

После окончания мейоза три верхние микроядерные макроспори дегенерируют, а нижняя, халазальная, становится зародышевым мешком (рис. 4, в). В ядре одноядерного зародышевого мешка видны пять, ярко красящихся по Фельгену хромосом. Микроядерные нуцеллусы в халазальной части зародышевого мешка дают более интенсивную реакцию Фельгена, чем в микроиллярной, и хромосомы в них выражены более четко.

В образовавшемся двухядерном зародышевом мешке нижний халазальный участок является более узким, чем верхний, — ядро, находящееся в нем, имеет меньшую величину (рис. 4, г). В ядре двухядерного зародышевого мешка хромосомы окрашены по Фельгену. Четырехядерный зародышевый мешок имеет изогнутую форму, так как в это время семязпочка расширяется и принимает камиллотронную форму. Два и три ядра расположены в микроиллярной части зародышевого мешка, являясь более крупными, чем сравнительно с находящимися в халазальном участке (рис. 4, д). Ядра четырехядерного зародышевого мешка также дают положительную реакцию Фельгена, дают лишь хромосомы, диффузная окраска ядер отсутствует.

После деления каждого из четырех ядер образуется восьмиядерный зародышевый мешок. Верхний, микроиллярный, участок сформированного восьмиядерного зародышевого мешка более широкий, а нижний, халазальный, — более узкий (рис. 4, е). Из четырех ядер, находящихся в халазальной части зародышевого мешка, три более мелкие ядра являются, по-видимому, ядрами антипод.

При формировании зародышевого мешка образуется яйцевой аппарат, состоящий из двух синергид и яйцеклетки, двух полярных ядер и трех антипод. Верхние участки синергид более узкие. Из всех ядер зародышевого мешка полярные ядра являются самыми крупными, а ядра антипод — самыми мелкими. Положительную реакцию Фельгена дают лишь ядра антипод. В этом отношении наши данные также совпадают с утверждением Г. М. Ильиной (1962) о том, что при формировании зародышевого мешка у горчицы положительную реакцию Фельгена обнаруживают все три ядра яйцевого аппарата.

В окончательно сформированном зародышевом мешке яйцеклетка располагается значительно глубже синергид и находится в непосредственной близости от центрального ядра — продукта слияния полярных ядер (рис. 4, ж). Из двух синергид одна обращена всегда несколько в профиль. Все ядра сформированного зародышевого мешка фелъгенотрицательны.

Таким образом, зародышевый мешок арабидопсиса относится к моноспорическому, восьмиядерному, или нормальному, типу зародыше-



шевого мешка. Перед оплодотворением он состоит из яйцеклетки, двух синергид и центральной клетки зародышевого мешка.

### ВЫВОДЫ

1. В момент образования археспориальной ткани длина пыльников у *Arabidopsis thaliana* составляет около 100—125 мк, а ширина отдельного гнезда — около 40—50 мк. В пыльниках можно различить покровы, спорогенную ткань и тапетум. В спорогенной ткани закладываются четыре группы спорогенных клеток. Археспорий многорядный, тапетум секреторного типа.

2. В ядре археспориальных клеток наблюдается образование микроядрышка, которое отпочковывается от основного.

3. Изучение ранних стадий профазы мейоза на постоянных препаратах представляет значительные трудности. Наиболее доступен анализу диакинез.

4. Деление материнских клеток микроспор проходит по симультантному типу. Расположение спор в тетраде тетраэдральное и изобилатеральное.

5. Спермиогенез проходит в пыльцевом зерне. Зрелое пыльцевое зерно трехклеточно, имеет толстую экзину со столбчатой структурой и три поры.

6. Завязь у арабидопсиса ложнодвухгнездная. В завязи закладывается 30—50 семязпочек тенуиницеллярного типа. Под эпидермисом семязпочки закладывается одна клетка археспория, которая непосредственно превращается в материнскую клетку макроспор. Сформированная семязпочка имеет кампилотропную форму.

7. Развитие зародышевого мешка проходит по нормальному типу. Халазальный конец зародышевого мешка на всех стадиях развития уже микропиларного, и ядра, находящиеся в нем, имеют меньшую величину. При формировании зародышевого мешка происходит отмирание антипод и слияние полярных ядер. Сформированный зародышевый мешок содержит яйцеклетку, две синергиды и центральную клетку зародышевого мешка.

### DEVELOPMENT OF MALE- AND FEMALE GAMETOPHYTES OF *ARABIDOPSIS THALIANA* (L.) HEYHN

T. F. Poliakova

The object of this investigation was the study of the processes of meiosis, pollen grain development, spermiogenesis and embryosac formation in *Arabidopsis thaliana*. Spermiogenesis in *A. thaliana* takes place within the pollen grain. The mature pollen grain consists of three cells. Its exina is thick and has a collumellar structure. The pollen grain has three pores. The embryosac is of monosporic eight-nucleate type. By the time of fertilization it contains an egg cell, two synergids and the central cell of the embryosac. The antipodal nuclei degenerate before the fusion of the polar nuclei.

### ЛИТЕРАТУРА

- Ильина Г. М. 1962. Вестник МГУ, 1: 34—45.  
Квитко К. В. и А. Мюллер. 1961. В сб.: Исследования по генетике, I. Изд. ЛГУ: 79—91.  
Laibach F. 1907. Bot. Zbl. Abt., I, 27: 5—24.  
Jaretsky. 1928. Jb. wiss. Bot., 69: 357.  
Steinitz-Sears L. 1962. Amer. j. Bot., 49 (6, pt. 2): 663—664.